

「海洋生物多様性および生態系の保全・再生に資する基盤技術の創出」
平成23年度採択研究代表者

H24 年度
実績報告

木暮一啓

東京大学大気海洋研究所・教授

超高速遺伝子解析時代の海洋生態系評価手法の創出

§1. 研究実施体制

(1)「総合解析」グループ

① 研究代表者: 木暮 一啓 (東京大学大気海洋研究所、教授)

② 研究項目

- ・海洋微生物群集の多様性解析のための標準プロトコル策定
- ・機能遺伝子発現解析のための条件検討

(2)「遺伝子解析基盤技術」グループ

① 主たる共同研究者: 岩崎 渉 (東京大学大気海洋研究所、講師)

② 研究項目

- ・海洋生態系解析のためのバイオインフォマティクス技術開発
- ・海洋生態系解析システム開発

(3)「遺伝子アーカイバ」グループ

① 主たる共同研究者: 福場 辰洋 (独立行政法人海洋研究開発機構、技術研究主任)

② 研究項目

- ・海洋遺伝子アーカイバ(MGA)システムプロトタイプ型装置の設計開始
- ・センサシステムの手配とシステムの中核としての基礎性能評価

§ 2. 研究実施内容

(2-1) 研究の狙い

- ① 多様性解析: 標準的なプロトコルを定め、淡青丸、白鳳丸、若鷹丸などの試料を用いて、原核生物の種の多様性解析、メタゲノム解析を実施する。
- ② 発現遺伝子解析: 特定細菌株 (*Krokinobacter* sp.) の光関連遺伝子および魚の塩分応答遺伝子について、その発現解析系を確立する。
- ③ 100GSA (100 Genes Set Analyses): 候補遺伝子および解析法の検討を行う。
- ④ バイオインフォマティクス技術開発: 総合解析班を通じて得た大量の海洋微生物および魚類の遺伝子データから、生態系および環境要因の特性を解析するための新技術の開発。
- ⑤ 海洋遺伝子アーカイバ (MGA) 試作: 基本設計の検討および基礎的な卓上試験、マイクロ流体デバイスおよびフィルタレス濃縮機構の検討を行う。

(2-2) 研究進捗状況および成果

- ① 多様性解析: 海洋微生物群集の多様性解析は DNA および mRNA を対象としたものに分かれるとともに、付着性、自由遊泳性に分けて解析を行うこととしてまずろ過法について検討を行った。その結果、メタゲノム用には大容量がろ過できる Steripak、RNA 用にはろ過効率の良い ϕ 47 mm Supor filter、特定遺伝子の PCR 用には ϕ 25 mm Supor filter を標準的に用いることにした。さらに複数の PCR primer 用いて、学術研究船白鳳丸 KH-11-10 次航海、平成 24 年度の若鷹丸および淡青丸航海で得られた試料に適用し、最終的に次世代シーケンサを用いて解析を行った。その結果、海域に特徴的な微生物群集構造の存在を明らかにした。さらに沿岸域の環境特性と群集組成との関連を解析中である。
- ② 発現遺伝子解析: 天然試料に適用する前に、培養系の微生物および水槽中の魚類を対象にした発現解析を行った。前者では海洋細菌、*Krokinobacter* sp. の Proteorhodopsin (PR) 遺伝子発現解析系の確立を行った。光条件に応じて細胞から mRNA を抽出し、PR の発現解析を行った。一方魚類についてはウナギとメダカとを用い、塩分の変動に応答する遺伝子のマッピングを行い、技術的にはほぼ確立されつつある。
- ③ 100GSA (100 Genes Set Analyses): 亜寒帯定点 K2 のメタゲノムデータを用いて KEGG Module Database から、季節変動の大きな Module を抽出した。その結果、変動の大きなグループとして ABC (ATP-binding cassette) transporter に属す、D-Methionine transport 系、Nitrate/nitrite transport 系などの輸送系の存在が明らかになった。今後の 100GSA の絞り込みに有力なフィールドデータとして使えると判断している。さらに、上記の魚類の発現遺伝子群の中から、環境応答系の遺伝子群、珪藻と微生物群集の混合培養系において出現する遺伝子群の中から抽出していく予定である。これによって、例えば沿岸から外洋にかけての生態系の特性を示す遺伝子群、異なる沿岸域の特性を示す遺伝子群、塩分あるいは温度変化などの環境要因の変動を鋭敏にキャッチする遺伝子群などの選択が可能

能になる。

- ④ バイオインフォマティクス技術開発： 三つのアプローチで技術開発を狙ってきた。第一に、2012年5月の若鷹丸航海にて得られた遺伝子解析データに関し、KEGG Orthology Databaseでの解析を行った。第二に、珪藻と微生物の混合実験系における凝集生成物の比較ゲノム解析を行い、凝集プロセスに関わる遺伝子群の抽出を試みた。第三に、今後の多量の遺伝子情報の集約に対応し、それらの情報を地球上の様々な微生物生態系と直結させるため、地球表層圏メタゲノムデータベースを構築しつつある。
- ⑤ 海洋遺伝子アーカイバ(MGA)試作： 24年度は、1)システムのサンプル処理量・処理時間等の検討、2)CTDを中核としたプロトタイプMGAシステムの構築と基礎的な卓上試験、3)マイクロ流体デバイスを用いた栄養塩等の生物・化学パラメタの分析手法検討とプロトタイプ構築、および4)フィルタレス濃縮機構に関する検討を行った。1)についてはサンプル処理量・処理時間については、1Lの海水を10分程度で処理できること、24サンプルまでの処理が可能であること等を所期仕様とした。また、使用するフィルタセットについては、20 μmメッシュ、1.6 μm GF/A、及び0.2 μmメンブレンの組み合わせに決定した。また、2)についてはスタンダードアロン型CTDに溶存酸素・PARセンサを導入し、生物活動に関連した環境因子の計測を可能にした。またピエゾ素子型マイクロポンプは生物濾過用としては吐出圧が不足するが、マイクロ流体デバイスへの適用は可能であること、小型ペリスタポンプ・シリンジポンプは生物濾過用に適用可能であることを確認した。3)マイクロ流体デバイスのプロトタイプ開発に関しては、アクリル樹脂製のデバイスを試作・評価可能な環境を整備し、実際にマイクロ流体デバイスのプロトタイプを作成した。現場分析の対象としては、微生物バイオマス指標となるアデノシン3リン酸(ATP)を当面の開発目標とし、デバイスの作成及びプロトタイプの構築に着手するとともに、高感度光検出システムを導入した。4)フィルタレスサンプル濃縮法については、マイクロ流体及びナノ流体デバイスを応用した粒子の濃縮法について、基礎的な検討を開始した。

(2-3) 今後の見通し

- ① 多様性解析： 第三開洋丸、新青丸、みらいで異なる海域からの試料を収集し、原核生物の種の多様性解析、メタゲノム解析を実施するとともに環境パラメタのデータを取得し、データベースに集約する。
- ② 発現遺伝子解析： 沿岸の微生物群集を対象にした発現遺伝子解析に着手し、方法論を確定させる。魚については塩分に加えて温度、光に対する応答遺伝子の発現解析系を確立する。
- ③ 100GSA (100 Genes Set Analyses)： 沿岸域の生態系の特性を明らかにするための候補遺伝子群を絞りこみ、その検出法の検討を行う。
- ④ バイオインフォマティクス技術開発： 総合解析班を通じて得た大量の海洋微生物および魚類の遺伝子データをデータベースに順次登録すると同時に、引き続き生態系の特性を解析

するための新技術の開発を目指す。

- ⑤ 海洋遺伝子アーカイバ(MGA)試作: CTD に小型ペリスタポンプおよびマイクロ流体デバイスを組み込んだ新たなシステムの構築を目指すと同時に、その現場での応用について検討を開始する。

§3. 成果発表等

(3-1) 原著論文発表

● 論文詳細情報

1. 岩谷芳自, 井上広滋, 竹井祥郎, 阿部宏喜, 環境浸透圧を異にしたカマキリ *Cottus kazika* の骨格筋中遊離アミノ酸の変化, *水産増殖 (Aquaculture Sci.)* 60: 495-501, 2012
2. Yamada, K., Kawanabe, A., Yoshizawa, S., Inoue, K., Kogure, K. and Kandori, H., Anomalous pH Effect of Blue Proteorhodopsin, *JOURNAL OF PHYSICAL CHEMISTRY LETTERS* 3 : 7: 800-804, 2012 (DOI: 10.1021/jz3000257)
3. Wong, M. K. S., Sower, S. A., and Takei, Y. , The presence of teleost-type angiotensin components in lamprey buccal gland suggests a role in endocrine mimicry, *Biochemie* 94: 637-648, 2012 (DOI: 10.1016/j.biochi.2011.09.015)
4. Miyamoto, H., Machida, R.J. And Nishida, S., Global phylogeography of the deep-sea pelagic chaetognath *Eukrohnia hamate*, *PROGRESS IN OCEANOGRAPHY* 104: 99-109, 2012 (DOI: 10.1016/j.pocean.2012.06.003)
5. Watanabe. T., and Takei, Y., Vigorous SO₄²⁻ influx via the gills is balanced by enhanced SO₄²⁻ excretion by the kidney in eels after seawater adaptation, *J. Exp. Biol.* 215: 1775-1781, 2012 (DOI: 10.1242/jeb.063511)
6. Wong, M. K. S., and Takei, Y., Changes in plasma angiotensin subtypes in Japanese eel acclimated to various salinities from deionized water to double-strength seawater, *Gen. Comp. Endocrinol.* 178: 250-258, 2012 (DOI: 10.1016/j.ygcen.2012.06.007)
7. Lancien, F., Wong, M. K. S., Arab, A. A., Mimassi, N., Takei, Y., and Le Mével, J.-C., Central ventilatory and cardiovascular actions of angiotensin peptides in trout., *Am. J. Physiol.* 303: R311-R320, 2012 (DOI: 10.1152/ajpregu.00145.2012)
8. Loretz, C. A., Pollina, C., Herberger, A. L., Hyodo, S., and Takei, Y. , Skeletal tissues in Mozambique tilapia (*Oreochromis mossambicus*) express the extracellular calcium-sensing receptor, *Comp. Biochem. Physiol.* 163A: 311-318, 2012 (DOI: 10.1016/j.cbpa.2012.07.015)
9. Tada, Y., Taniguchi, A., Sato-Takabe, Y. and Hamasaki, K., Growth and succession patterns of major phylogenetic groups of marine bacteria during a mesocosm diatom bloom, *J. Oceanogr.* 68: 509-519, 2012 (DOI: 10.1007/s10872-012-0114-z)
10. Wong, M. K. S., and Takei, Y., Angiotensin AT₂ receptor activates the

- cyclic-AMP signaling pathway in eel, *Mol. Cell. Endocrinol.* 365: 292-302, 2013 (DOI: 10.1016/j.mce.2012.11.009)
11. Miyanishi, H., Okubo, K., Nobata, S., and Takei, Y., Natriuretic peptides in developing medaka embryos: Implications in cardiac development by loss-of-function studies, *Endocrinology* 154: 410-420, 2013 (DOI: 10.1210/en.2012-1730)
 12. Miyanishi, H., Okubo, T., Kaneko, T., and Takei, Y., Role of cardiac natriuretic peptides in seawater adaptation of medaka embryos as revealed by loss-of-function analysis, *Am. J. Physiol.* 304: R423-R434, 2013 (DOI: 10.1152/ajpregu.00384.2012)
 13. Keiichi Inoue, Hikaru Ono, Rei Abe-Yoshizumi, Susumu Yoshizawa, Hiroyasu Ito, Kazuhiro Kogure, Hideki Kandori, A light-driven sodium ion pump in marine bacteria, *Nat. commun.* (in press) (DOI: 10.1038/ncomms2689)
 14. Tada, Y., Makabe, R., Kasamatsu-Takazawa, N., Taniguchi, A. and Hamasaki K., Growth and distribution patterns of Roseobacter/Rhodobacter, SAR11, and Bacteroidetes lineages in the Southern Ocean, *Polar Biology* (in press) (DOI: 10.1007/s00300-013-1294-8)
 15. Sanghwa Park, Yokota Akira and Kazuhiro Kogure, The Family Rhoderthermaceae. *In Prokaryotes.* (in press)
 16. Takei, Y., Miyanishi, H., Nobata, S., Wong, M. K. S., Watanabe, T., Ventura, A., Shiozawa, A., Hyodo, S., and Kusakabe, M., Establishment and validation of an aquarium system to evaluate salinity preference in conscious rainbow trout, *Coast. Mar. Sci.* (in press)